

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 06 July 2001 (06.07.01)	
International application No. PCT/JP00/06147	Applicant's or agent's file reference M1-A0004P
International filing date (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00)	Priority date (day/month/year) 10 September 1999 (10.09.99)
Applicant MURAMATSU, Takashi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

22 February 2001 (22.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer H. Zhou Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6f
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 20 décembre 2001 (20.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference M1-A0004P	
International application No. PCT/JP00/06147	International filing date (day/month/year) 08 septembre 2000 (08.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD 3-6, Kyobashi 2-chome Chuo-ku, Tokyo 104-0031 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: The applicant identified in Box 1 has been deleted from the record.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Y. KUWAHARA
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 03 AUG 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 M1-A0004P	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 00/06147	国際出願日 (日.月.年) 08.09.00	優先日 (日.月.年) 10.09.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁷ G01N 33/574		
出願人 (氏名又は名称) 明治乳業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)

この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日
22.02.01

国際予備審査報告を作成した日
18.07.01

名称及びあて先
日本国特許庁 (IPEA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J 9 2 1 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-14	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-14	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-14	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : Cancer Res., Vol. 55, No. 8, P. 1792-1797 (1995)

文献2 : British J. Cancer, Vol. 79, No. 1, P. 179-184 (Jan. 1999)

文献3 : JP, 6-172218, A

請求の範囲1-12は、文献1-3より進歩性を有しない。

文献1には、神経芽細胞腫のstage IにおいてミッドカインのmRNAが発現していることが記載されている。また、文献1には、胃癌や肺癌などにおいても、ミッドカインが発現していること (P. 1796 左欄下から17行目の段落) が記載されている。

文献2には、ヒト結腸癌の早い段階においてミッドカインが発現していることが記載されている。

一方、文献3には、抗ミッドカイン蛋白質抗体を用いて癌を診断することが記載されており、文献1及び2に記載された知見に基づいて、早期癌を検出することは、当業者が容易になし得たことである。

請求の範囲13-14は、文献1-3より進歩性を有しない。

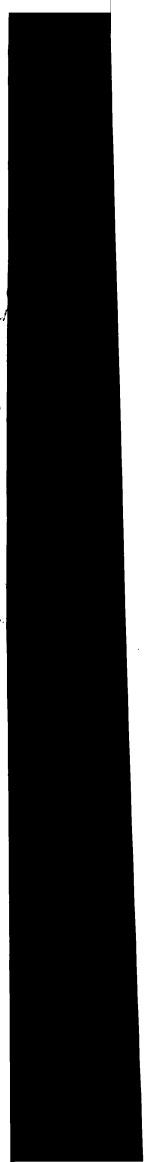
癌に関連することが公知のミッドカインの測定値を癌の予後判定に用いることは、当業者が容易に想到し得たことである。

特に、文献1のFig. 3には、ミッドカインの発現レベルが、患者の生存率と関連することが記載されている。

THIS PAGE BLANK (SECRET)

THIS PAGE BLANK (uwrto)

THIS PAGE BLANK (uwrto)



与えられる文献

及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

関連する
請求の範囲の番号

(三井東圧化学株式会社)

1 - 1 4

06.94 (21.6月.1994) (ファミリーなし)

WO, 00/31541, A (Georgetown University)

1 - 1 4

02.06.00 (02.6月.2000) (ファミリーなし)

JP, 6-113898, A (三井東圧化学株式会社)

1 - 1 4

26.04.94 (26.4月.1994) (ファミリーなし)

THIS PAGE BLANK (uspto)

57
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference M1-A0004P	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06147	International filing date (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00)	Priority date (day/month/year) 10 September 1999 (10.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/574		
Applicant MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 February 2001 (22.02.01)	Date of completion of this report 18 July 2001 (18.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Cancer Res. Vol. 55, No. 8, 1995, pp. 1792-1797

Document 2: British J. Cancer, Vol. 79, No. 1, Jan. 1999, pp. 179-184

Document 3: JP, 6-172218, A

Based on documents 1-3 the inventions set forth in Claims 1-12 do not appear to involve an inventive step.

Document 1 states that the mRNA of midkine is expressed in stage I neuroblastomas. Document 1 also states that midkine is expressed in stomach cancer, lung cancer and the like (paragraph on p. 1796, left column, line 17 from bottom).

Document 2 states that midkine is expressed in the early stages of human colon cancer.

Document 3 describes the diagnosis of cancer using an anti-midkine protein antibody, and persons skilled in the art can easily perform the early detection of cancer based on the knowledge described in documents 1 and 2.

Based on documents 1-3, the inventions set forth in Claims 13 and 14 do not appear to involve an inventive step.

Persons skilled in the art can easily conceive of using the measured value of midkine, which is publicly known to be linked to cancer, for a prognostic determination of cancer.

More specifically, document 1 Fig. 3 shows that the expression level of midkine is associated with patient survival rate.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月22日 (22.03.2001)

PCT

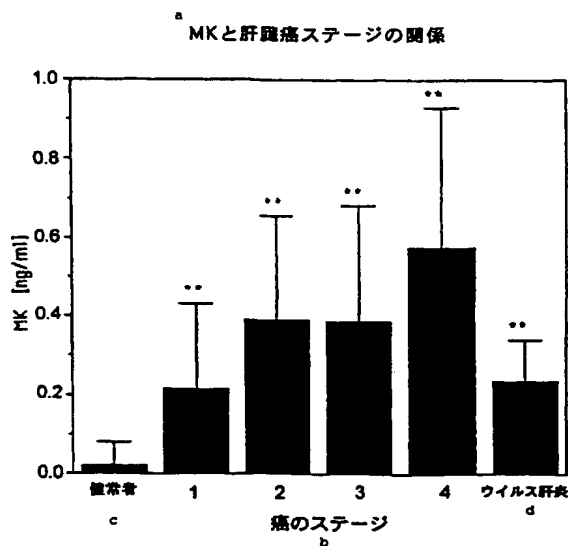
(10) 国際公開番号
WO 01/20333 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/574 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治乳業株式会社 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD) [JP/JP]; 〒104-0031 東京都中央区京橋2丁目3番6号 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06147
- (22) 国際出願日: 2000年9月8日 (08.09.2000) (71) 出願人 および
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (72) 発明者: 村松 喬 (MURAMATSU, Takashi) [JP/JP]; 〒468-0021 愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石 2845-161 Aichi (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: (72) 発明者; および
- 特願平11/256678 1999年9月10日 (10.09.1999) JP (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡本好司 (OKAMOTO, Kohji) [JP/JP]; 〒806-0043 福岡県北九州市八幡西区青山3-18-13-502 Fukuoka (JP). 池松真也 (IKEMATSU, Shinya) [JP/JP]. 佐久間貞俊 (SAKUMA, Shinya) [JP/JP].
- 特願平11/345404 1999年12月3日 (03.12.1999) JP
- 特願2000/33168 2000年2月10日 (10.02.2000) JP

[続葉有]

(54) Title: EARLY CANCER TUMOR MARKER

(54) 発明の名称: 早期癌腫瘍マーカー



(57) Abstract: It is found out that MK (midkine) appears at the early stage in the blood or urine of patients with various cancers. Based on this finding, a method of detecting early cancer involving the step of measuring MK in the blood or urine is completed.

(57) 要約:

a...RELATIONSHIP BETWEEN MK AND LIVER CANCER
b...CANCER STAGE
c...NORMAL SUBJECT
d...VIRAL HEPATITIS

さまざまな癌を有する患者の血中あるいは尿中には、早いステージでMK (ミッドカイン) が出現し、することを見出した。そしてこの知見に基づいて、血中あるいは尿中のMKを測定する工程を含む早期癌の検出方法を完成した。

WO 01/20333 A1



Sadatoshi) [JP/JP]; 〒250-0862 神奈川県小田原市成田
540番地 明治乳業株式会社 医薬事業部内 Kanagawa
(JP). 小田宗宏 (ODA, Munehiro) [JP/JP]; 〒250-0862
神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社
食品機能研究所内 Kanagawa (JP). 熊井英志 (KUMAI,
Hideshi) [JP/JP]; 〒250-0862 神奈川県小田原市成田
540番地 明治乳業株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開 類:
— 国際調査報告

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明細書

早期癌腫瘍マーカー

技術分野

本発明は、早期癌を検出するための腫瘍マーカーに関する。

背景技術

癌の進展ないし拡大の程度は、早期癌、進行癌、末期癌と表現される。このうち早期癌とは、一般的に“小さく、転移も少なく、治療によって永久ないし長期治癒が得られる進行度の癌”として位置づけられている。

早期癌は基本的には無症状である。したがって、早期癌を完全に近く検出するには、無症状の被験者を対象とする検査となる。幅広く無症状の被験者を対象として、特定の疾患に罹患した患者を見つけ出すための検査、あるいはより高度な二次的な検査が必要な対象者を絞り込むための検査を、一般にスクリーニングと呼んでいる。スクリーニングは、一般に検査対象の数が極端に多い。多くの検査対象者を検査するためには、先ずは簡便で、かつ経済的でなければならない。腫瘍マーカー検査は、患者への侵襲が少なく好適な検査法であるが、現時点では、腫瘍マーカーの測定により、早期癌を検出することは、通常は不可能とされている。

ミッドカイン（以下、「MK」と称する）は、レチノイン酸応答遺伝子の産物として発見された増殖分化因子で、塩基性アミノ酸とシステインに富む分子量13kDaのポリペプチドである（Kadomatsu, K. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 151 : 1312-1318; Tomomura, M. et al. : J. Biol. Chem., 265 : 10765-10770, 1990）。MKは、さまざまな悪性腫瘍において、その周辺の正常組織と比較して増強しているので、発癌において重要な役割を果たしていることが

示唆されている。そこで、MK遺伝子をプローブとしたノーザンブロットによる癌の診断法（特開平6-113898）、および抗MKタンパク質抗体を含む癌の診断薬（特開平6-172218）が提案されている。しかしながら、これらの公開特許には、MK遺伝子、あるいはMKタンパク質が、早期癌検出に有用であるとの記載も示唆もなされていない。その後 Yeらは、ヒト結腸癌のアデノーマ段階における前癌組織で、MKの発現が上昇していることを報告している（Ye C. et al.: Br. J. Cancer., 79 : 179-183, 1999）。しかしながら、この論文には、早期癌の検出については記載も示唆もなされていない。

したがって、早期癌の状態から検出されうる腫瘍マーカーの発見および検査法の開発が望まれている。

発明の開示

本発明は、早期癌のマーカーとして有用である新規なポリペプチドを提供することを課題とする。また、本発明は、該ポリペプチドを指標とする早期癌の検出方法の提供を課題とする。さらに、本発明は、該ポリペプチドを検出することができる早期癌の体外診断薬を提供することを課題とする。

本発明者らは、肝細胞癌患者において、抗MK抗体により検出されるMKレベルが、健常者や肝炎患者に比べ、肝細胞癌の組織中だけでなく、血中や尿中においても、肝細胞癌の早いステージで、有意に増大していることを見出した。また胃癌についても、肝癌と同様に早いステージで、血中や尿中のMKレベルが有意に増大することを見出した。さらに、食道癌、十二指腸癌、結腸癌、胆管及び胆嚢癌、膵臓癌、甲状腺癌、肺癌、及び乳癌など多くの癌において、癌の早期において、血清中MKレベルが有意に上昇していることを見出した。すなわち、MKが、不特定癌の検出に対して、公知の腫瘍マーカーにはみられない、非常に広いスペクトルを有していることを示している。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、MKが、早期癌のマーカーとして有用であることを明らかにした。そして、本発明者らが開発した、簡便な高感度な

1ステップサンドイッチ法を用いて、あらゆる癌について、早期に患者の体液中に出現するMKレベルを、E I Aにより高感度に検出することにより、早期癌のスクリーニング診断を可能とした。E I Aは、全自動化が可能で、早期癌の検出を目的とするMKの測定方法として非常に有用である。

すなわち本発明は、以下の早期癌の検出方法、あるいは早期癌の診断方法、並びにこれらの方法のための診断剤、およびキットに関する。

〔1〕次の行程を含む、早期癌の検出方法：

a) 生物学的試料中のミッドカインおよび／またはそのフラグメントを測定する行程、

b) 行程a) によって得られる測定値を正常者の測定値と比較する行程、

〔2〕早期癌が、胃癌である〔1〕に記載の方法。

〔3〕胃癌がステージ1である〔2〕に記載の方法。

〔4〕早期癌が、肝細胞癌である〔1〕に記載の方法。

〔5〕肝細胞癌がステージIである〔4〕に記載の方法。

〔6〕早期癌が、肺癌である〔1〕に記載の方法。

〔7〕肺癌がステージIである〔6〕に記載の方法。

〔8〕生物学的試料が血清または尿である〔1〕に記載の方法。

〔9〕ミッドカインおよび／またはそのフラグメントを認識する抗体の早期癌の検出における使用。

〔10〕ミッドカインおよび／またはそのフラグメントを認識する抗体からなる早期癌の診断剤。

〔11〕生物学的試料中のミッドカインおよび／またはそのフラグメントの存在を決定するための早期癌検出キットであって、ミッドカインおよび／またはそのフラグメントの少なくとも1つのエピトープと特異的に結合する抗体を収容する容器を含む早期癌検出キット。

〔12〕前記抗体が固相に吸着している〔11〕に記載の早期癌検出キット。

〔13〕 次の行程を含む、癌の予後判定方法。

a) 生物学的試料中のミッドカインおよび／またはそのフラグメントを測定する行程、

b) 行程a) によって得られる測定値を癌の予後判定と関連付ける工程、

〔14〕 癌が、胃癌、肝細胞癌、または肺癌である〔13〕に記載の方法。

定義

本明細書で用いられる以下の用語は、他に断らない限り、以下の意味を有する。

「早期癌」とは、腫瘍が発生した局所（粘膜内）に限局していて、周囲組織への浸潤のないもの、あるいは浸潤があってもその範囲が局所に限局しているものを言う。特に、浸潤が見られないものは、公知の腫瘍マーカーでその存在を検出することが困難であったことから、本発明における重要な検出対象である。この定義は、皮膚、口腔、気道、消化管、子宮頸部、卵巣、胆嚢、膀胱などほとんどの癌にあてはめることができる。早期癌はTNM分類のステージ0（carcinoma in situ）とステージIを含み、この病期では、脈管内侵襲や遠隔転移はなく、局所の腫瘍切除だけで完治できる。

本発明において、「腫瘍マーカー」とは、腫瘍細胞またはその存在に反応した細胞が産生する物質で、組織、体液、排泄物などのなかに見出され、腫瘍の存在、性状、あるいは広がり等の腫瘍が有する何らかの性状の指標とする物質と定義される。

「MK」とは、全長MKタンパク質、及びMKの生物活性を有する任意の長さのアミノ酸配列を有するフラグメントを含む。Nドメインを欠く変異型MKが癌特異的に発現しており（Kaname T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 219: 256-260, 1996）、このような変異型MKも含む。遺伝子組み換え技術によって生成されたMK、および化学合成されたMKは、本明細書では交換可能に用

いられる。ヒト全長MKをコードするDNA配列は公知（米国特許：5,461,029）である。MKの生物活性とは、MKが細胞に与える生理的な作用のみならず、抗MK抗体との免疫学的な反応性も含む。

「感度」とは、腫瘍が存在する群での測定値が陽性となる比率であり、陽性率ともいわれる。

「特異性」とは、腫瘍が存在しない群での測定値が陰性となる比率であり、陰性率ともいわれる。

「生物学的試料」とは、生物より得ることができる試料を意味する。より具体的には、例えば、血液、血清、尿、及びその他の分泌物等を挙げることができる。これらの生物学的試料の中でも、尿は侵襲性の低い試料として有用である。尿量は変動の幅が大きいので、尿中成分の濃度をより正確に比較するには尿量補正を行うのが望ましい。尿量を補正する手法として、クレアチニン補正等の手法が公知である。

「ステージ分類」とは、一般に癌の肉眼的進展度による分類として、TNM分類（tumor-node-metastasis staging）が国際的に広く用いられている。本発明で用いる“ステージ分類”は、TNM分類に対応している〔臨床・病理 原発性肝癌取り扱い規約：22p. 日本肝癌学研究会編（改訂第3版），金原出版，1992〕。

また本発明において、「癌の検出」とは、被験者の生体内に癌が存在する可能性が高いと判定することを意味する。検出に対して、スクリーニングという用語は、特に任意の集団を対象として癌が存在する可能性が高い被験者を絞り込むことを目的として行われる検査を指す用語である。一方、スクリーニングが任意の集団を対象とするのに対して、特定の被験者を対象に癌を検出することを、特に診断と言う。本発明においては、スクリーニングと診断とは、その対象が異なっているだけで、いずれも本発明による癌の検出方法に含まれる。

癌細胞がつくるマーカーは、癌がある程度大きくなるまで血中レベルは健常人

の基準値と変わらないため、血清マーカーの増加から早期癌を検出することは、上記したように、通常は不可能とされている。

本発明者らは、MKが、結腸癌の前癌段階で、mRNAレベルおよびタンパクレベルで高発現 (Ye C. et al.: Br. J Cancer., 79 : 179-183, 1999) していることから、さまざまな種類の癌を有する患者の血中MKレベルを調べたところ、ほとんどの患者 (87%) で、血中MKレベルが、健常人の血中MK量と比較して、有意に上昇していることを見出した。この87%という数値は、既存の腫瘍マーカーと比較して、きわめて高い数値である。癌組織で発現したMKは、おそらく血中に分泌され、このため血中MKレベルが増加していると考えられる。さらに、肝細胞癌、胃癌、肺癌などでは、血中MKレベルが、癌の早期に上昇していた。

肝細胞癌あるいは肺癌患者血中のMKレベルは、ステージIで、既に、健常人の基準値に比較して有意に上昇しており、ステージII~IVでは、さらなる上昇が見られた。これに対し、胃癌患者では、ステージ1で、健常人の基準値に比較して有意に上昇しているが、ステージ2以降もステージに関係なくMKレベルがほぼ同じ値で推移した。これらのことから、MKの測定によって、肝細胞癌、肺癌、あるいは胃癌をはじめとする幅広い癌において、ステージIに分類される早期癌の検出が可能であることが明らかである。更にMKの測定によって、癌の増大やMKの蓄積によらずに、早期癌のみならずあらゆるステージの癌をも検出できるということができる。この特徴は、腫瘍マーカーとしては重要である。なぜなら、早期癌のみに見出される腫瘍マーカーでは、進行した癌を見落とす恐れがある。

さて、一般に腫瘍マーカーの有用性は、癌患者を陽性と判定する「感度」、非癌患者を陰性と判定する「特異性」などによって評価される。ところが公知の各腫瘍マーカーの感度や特異性には限界がある。

MKの場合は、実施例において示すようにさまざまなタイプの不特定癌において、早期に血中や尿中のMKレベルが健常人の基準値に比較して上昇する。すな

わち、不特定癌に対する広いスペクトルを有し、感度が高いといってよい。臓器を問わず幅広く早期癌のスクリーニングを行うには、特定癌に対する高い検出感度、特異性ととともに、不特定癌検出に対する広いスペクトルが求められる。MKは、このようなスクリーニングに必要な感度と特異性を備えていると言える。

更に、本発明に基づく早期癌の検出方法によって、公知の腫瘍マーカーの感度や特異度の限界を補うことができる。複数の腫瘍マーカーを組み合わせることによって、ある一定の特異性を維持しつつ、感度を上昇させることができる場合があることが知られている。感度や特異度の改善につながる複数の腫瘍マーカーを組み合わせたスクリーニング方法は、一般にコンビネーションアッセイ (combination assay) と呼ばれている。

本発明において、無症状の被験者を対象としたスクリーニングで、被験者の血液や尿中のMKレベルをEIA等で測定することにより様々なタイプの悪性腫瘍の存在を早期のステージで検出することができる。更に、他の腫瘍マーカーの測定を組み合わせることによって、感度や特異度を向上させることができる場合がある。

combination assayを行うに当たっては、2つの考慮すべき点がある。一つは、どの腫瘍マーカーを組み合わせに選択するかである。そして組み合わせる腫瘍マーカーが決定したとして、次に考慮すべき点は、そのcut off値をいかに定めるかである。

腫瘍マーカーの選択のポイントは、できるだけ相関の低い組み合わせを選択することである。例えば、肝癌マーカーであるAFPとPIVKA-IIは相関が低く、PIVKA-IIのcut off値を0.1 Au/mlにとるとほぼ100%の特異性を示す。一方、膵癌マーカーであるCA19-9とCA-50を組み合わせると真陽性の症例は同一で、偽陽性の症例は重なりがない組み合わせとなり、効率が悪い組み合わせとなる。

組み合わせる腫瘍マーカーが選択されると、次の段階はcut off値の設定である。cut off値は、感度と特異性を左右する重要な要素である。一般に腫瘍マ-

カーの感度と特異性とはtrade off の関係にあるが、当業者であれば、適切なcut off値は、関連文献（例えば、川村 武：腫瘍マーカー．日本臨床 54：1649-1653，1996）を参照して設定することが可能である。

理想的な腫瘍マーカーは、腫瘍群と非腫瘍群での測定値が重なり合わず、測定値が腫瘍の存在を決定できる。しかしこのような理想的な腫瘍マーカーは、これまで開発されていない。このため、腫瘍群と非腫瘍群を識別・鑑別する最も適切なcut off値を設定する必要がある。

一つの好適な態様において、cut off値は固相化抗体が、癌の存在しない患者からのサンプルとインキュベートするとき得られるシグナルの平均値である。通常、予め決定したcut off値の標準偏差の3倍のシグナルを生じるサンプルは、癌に対して陽性であると考えられる。cut off値は、健常者の測定値の分布の95%信頼区間（基準範囲）の上・下限値が用いられることが多い。しかし、基準範囲の設定では、病態の分布が一切考慮されていない。そこで、cut off値は、その検査で識別すべき病態を明確に定義し、それに基づいて、その疾患群と非疾患群を一定数集め、検査し、2群の測定値の分離度（検査の分別能）と有病率（検査が適用される状況）を考慮して決めるのが望ましい。この方法によって決定されるcut off値より高いシグナルを生じるサンプルは癌に対して陽性と考えられる。

更に肝細胞癌患者の場合、腫瘍を外科的に除去した後、血中のMKレベルが著明に低下した。このことは、MKが癌の診断のみならず、病状経過のモニタリングの指標、予後判定の因子、あるいは再発のモニターとして有用であるということができる。予後とは、治療に対する患者の反応を意味する。したがって、腫瘍の治療の前後においてMKを測定し、MKの測定値の低下が認められれば、有効な治療が行われていることが推測できる。更に、MK測定値が健常者の値にまで低下すれば、腫瘍の治療が成功したことが推測される。腫瘍の治療とは、外科的な除去をはじめとして、放射線療法、免疫療法、あるいは化学療法などを例示する

ことができる。

また他の態様において、MKは、ある種の癌、例えば肝細胞癌の進行に対してのマーカーとして用いることができる。肝細胞癌においては、MKはステージの進行に伴い血中MKレベルが上昇する。癌診断に対して上記に記載したようなアッセイは、経時的に複数回（オーバータイム）行い、MKのレベルの変化を評価する。例えば、該アッセイは、6ヶ月から1年の期間24-72時間ごとに行い、そしてその後必要に応じて行う。一般に、抗体によって検出されるMKがオーバータイムで経時的に増加する患者においては、癌は進展している。

本発明において、生物学的試料中のMKレベルは、ラテックス凝集法、MKに対する特異的ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を用いたEIAやRIA法、FIA、化学発光イムノアッセイ、あるいはECLIA法などを用いて測定することができる。このうちEIAは、本発明におけるMKの測定手法として好適である。EIAは酵素を標識として用いることから、放射性廃棄物や半減期の問題を伴うRIAに比べて、容易に実施することができる。また、理論的には、RIAよりも測定法の高感度化が可能である。

その他に、EIAに関しては、さまざまなアッセイ系が当業者に知られている（例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照）。特にMKの測定に関しては、優れたEIA法が開発されており（特開平10-160735）、当業者であれば、この公知方法を、検出目的に沿って適宜改良することができる。

関連ある態様において、アッセイは、抗体をニトロセルロースのようなメンブレン上に固相化したフロースルー（flow-through）又はストリップテスト型を用いて実施できる。フロースルーテストにおいては、サンプルがメンブレンを通り抜けるとき、サンプル中のMKは固相化抗体に結合する。次に、該第二抗体を含む溶液がメンブレンを通り抜けるとき、標識した第二抗体が、抗体-ポリペプチド複合体に結合する。次に、結合した第二抗体を上記したように検出する。スト

リップテスト型においては、抗体が結合したメンブレンの一端をサンプルを含む溶液中に浸す。サンプルは、第二抗体を含む領域を通過するようにメンブレンを移動し固相化抗体のエリアに向かって移動する。固相化抗体のエリアにおける第二抗体の濃度が癌の存在を示す。代表的には、その部位における第二抗体の濃度は、視覚的に読みとることができるラインのような一つのパターンを生じる。このようなパターンが存在しない場合は陰性結果を示す。一般に、メンブレンに固相化される抗体の量は、視覚的に識別できるパターンを生じるように選択される。その場合、生物学的試料が、2抗体サンドイッチアッセイにおいて陽性シグナルを生じるに十分なMKのレベルを含む。好ましくは、メンブレン上に固相化される抗体の量は、およそ25 ng～1 μ gであり、さらに好ましくは、およそ50 ng～500 ngである。このようなテストは通常、非常に少ない量の生物学的試料で行う。

フロースルー (flow-through) 又はストリップテストタイプのアッセイフォーマットにおいては、シグナル強度を機械的に読み取ることにより定量的な測定が可能である。あるいは、一定濃度以上のMKが存在するときのみ陽性結果を生じるように感度を調整することもできる。感度の調整によって、陽性結果を特別な装置を用いることなく視覚的に判定することができる。この種のアッセイフォーマットにおける感度を調整する方法は、当業者にとって周知の技術である。たとえば、抗体の使用量を調整することにより、感度を変化させることができる。

勿論、他に多数のアッセイプロトコールが本発明の抗原或いは抗体とともに使用に対して好都合である。上記の記載はほんの例示的なものを意図している。

以上のような各種のアッセイプロトコールに必要な抗MK抗体や、標準試料として用いられるMKは、早期癌の検出用キットとして有用である。本発明による早期癌の検出用キットとは、少なくとも抗MK抗体と、標準試料として用いられるMKとからなる。本発明の検出用キットには、この他に、標識成分の検出に必要な酵素基質、陰性対照、及び取り扱い指示書等を組み合わせることができる。

検出用キットがE I Aなどの手法に用いられる場合には、前記抗MK抗体は、予め固相担体に結合させておくことができる。固相には、一般に、反応容器、ビーズ、あるいは磁気粒子等が用いられる。抗MK抗体を予め固相に結合させておくことにより、E I Aの操作を容易に行うことができるのみならず、自動化にも貢献する。

上記方法で使用する抗MK抗体は、当業者に公知の様々な技術によって作製することができる（例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988参照）。抗MK抗体は、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体であってもよい。たとえば本特許出願人による特許出願2000-272199号（平成12年9月7日出願）に記載されたような、MKを特異的に認識するモノクローナル抗体を本発明に利用することができる。抗MK抗体は、その抗原結合部位を含む断片として用いることもできる。さらに、抗体は単鎖、キメラ、CDR-グラフト、又はヒト化されたものであってもよい。抗体はここに記載された方法及び当業者によく知られたその他の方法によって作製され得る。

本発明の抗MK抗体作成のための免疫原や、標準試料としてMKが用いられる。これらに用いるMKは、生体由来MK、組み換えMKあるいは化学合成MK、さらにMKの生物活性を有する断片を含む。MKを組み換え体として得る方法は、公知である（特開平9-95454）。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

図1は、ステージI～IVの肝細胞癌患者76名（ステージI：7名、ステージII：19名、ステージIII：23名、及びIV：27名）、比較対照として、ウイルス肝炎患者7名、及び対照として健常人135名の血清中のMKレベルを、実施例2の（1）に記載の1-ステップサンドイッチ法で測定した結果を示す図であ

る (** $p < 0.01$)。エラーバーは標準偏差を示す。

図2は、同じくステージI～IVの肝細胞癌患者76名、比較対照として、ウイルス肝炎患者7名、及び対照として健常人376名の血清中のMKレベルを、実施例2の(2)に記載の1-ステップサンドイッチ法で測定した結果を示す図である (** $p < 0.01$ 、Mann-WhitneyのU検定)。エラーバーは標準偏差を示す。

図3は、同じくステージI～IVの肝細胞癌患者の血清中におけるPIVKA-IIを、エイテストPIVKA-II (三光純薬株式会社) を用いて測定した結果を示す図である。エラーバーは標準誤差を示す。

図4は、同じくステージI～IVの肝細胞癌患者の血清中のAFPを、 α -フェト・リアビーズ (ダイナボット社) を用いて測定した結果を示す図である (* $p < 0.01$)。エラーバーは標準誤差を示す。

図5は、ステージ1～7の胃癌患者72名、及び健常者135名のそれぞれの血清中のMKレベルを、実施例2の(1)に記載の1-ステップサンドイッチ法で測定した結果を示す図である。エラーバーは標準偏差を示す。

図6は、同じくステージ1～7の胃癌患者72名、及び健常者376名の血清中のMKを、実施例2の(2)に記載の1-ステップサンドイッチ法で測定した結果を示す図である (** $p < 0.01$ 、Mann-WhitneyのU検定)。エラーバーは標準偏差を示す。

図7は、同じくステージ1～7の胃癌患者72名の血清中のCEAを、CEAリアビーズ (IRMA法) (ダイナボット社) を用いて測定した結果を示す図である。エラーバーは標準誤差を示す。

図8は、同じくステージ1～7の胃癌患者72名の血清中のCA19-9を、セントコアCA19-9キット (IRMA法) (Centocor社) を用いて測定した結果を示す図である。エラーバーは標準誤差を示す。

図9は、72名の癌患者尿 (胃癌: 24名、肝細胞癌: 24名、及び大腸癌: 24名)、及び50名の健常者の尿中のMKレベルをクレアチニン値で補正した

値の分布を示す図である ($p < 0.01$; 統計ソフト StatView-J5.0; Mann-Whitney のU検定を使用)。

図10は、胆管癌3名、乳癌3名、大腸癌6名、食道癌3名、胆嚢癌1名、肝細胞癌10名、膵臓癌3名、直腸癌7名、胃癌28名、及び甲状腺癌1名の計65名のステージ1～7における尿中MKレベルをクレアチニン値で補正した結果を示す図である (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。エラーバーは標準偏差を示す。

図11は、肝細胞癌切除が血清中MK値に及ぼす影響を示す図である。点を含む棒は腫瘍切除前(pre-op)、黒く塗りつぶされた棒は腫瘍切除後(Day 7)を示す。

図12は、さまざまなタイプの癌における血清中のMKレベルを比較した図である。太線は健常者135名の血清中のMKレベルの平均値を示し、点線はcut off 値 0.50 ng/ml を示す。各タイプの癌の名前の下に示す数字は、患者数、中央値、及び25～75%信頼区間を示す。アスタリスクは健常者に対して有意差 (Mann-Whitney U-test) を示す。*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例及び試験例により説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

[実施例1] 抗ヒトMKポリクローナル抗体の作製

免疫に用いるMKタンパク質、及び標準物質 (standard material) として用いる組換えMKタンパク質は、特開平9-95454の実施例1に記載されている方法に準じて作製した。

ビキア酵母を宿主とする発現ベクターPHIL-D4に、ヒトMKのORFをカバーするcDNAを導入した。このMK発現ベクターを、ビキア酵母G115 (ビキアバストリス G115; Research Corporation Technologies) にトランスフェクションした。ヒスチジン及びG418選択によりMK発現クローンを得た。MKは、イオン交換クロマトグラフィー及びヘパリンカラムによるアフィニティー

クロマトグラフィーにより精製した。精製MKタンパクの神経栄養活性は、組み換えL細胞が産生したマウスMKのそれと類似していた。

ウサギ、及びニワトリに対する免疫注射は、ウサギの場合は、2週間おきに計6回、ニワトリの場合は、2週間おきに計8回行った。

すなわち、ウサギの場合は、初回に、400 μ gのMKをフロイント完全アジュバントと等量混合したものを、ウサギの皮下に注射し、2回目以降は、1回あたり400 μ gのMKをフロイント不完全アジュバントと混合したものを皮下に注射した。ニワトリの場合は、1回あたり100 μ gのMKを用いニワトリに注射した他は、ウサギと同様であった。

ウサギから得た抗血清は、硫酸で塩析した後、プロテインAカラムでIgGを単離し、さらに、MKをAffigel-10™ (Bio Rad) に固定化したMKアフィニティカラムにより、アフィニティ精製して、精製ウサギ抗ヒトMK特異的抗体を得た。一方、ニワトリから得た抗血清は、硫酸で塩析の後、MKアフィニティカラムでアフィニティ精製して、精製ニワトリ抗ヒトMK特異的抗体を得た。これらの抗体は、ウエスタンブロット解析でヒトMKを特異的に検出した。

[実施例2] 1-ステップサンドイッチ法によるMKの測定

(1) ウサギ抗ヒトMK抗体を、0.1%NaN₃を含む50mM PBS (pH7.2) に溶解 (5.5 μ g/ml) し、その50 μ lを、マイクロタイタープレート (Polysorp plates, Nunc) の各ウェルに分注した。プレートを室温で16時間おき、抗体をウェルに吸着させた。0.1%Tween 20を含むPBSでウェルを洗浄後、0.5%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBS 150 μ lを各ウェルに加え、37℃で2時間インキュベートし、ブロッキングした。

一方、肝癌の各ステージの血清サンプル、胃癌の各ステージの血清サンプル、あるいは健常人血清サンプル (コントロール) 各々10 μ lは、0.5M KCl、0.5%BSA、および0.01%Microcide I (aMReSCO, Solon, Ohio) を含む50mM Tris-HCl (pH8.4) に溶解したベルオシシダーゼ標識ニワト

15

リ抗ヒトMK抗体 ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) $100 \mu\text{l}$ と反応させた。この反応液 $50 \mu\text{l}$ を、プレートの各ウエルに加え、室温で1時間インキュベーションした。各ウエルを、 1% Tween 20を含むPBSで5回洗浄した。基質溶液 ($0.5 \text{mg}/\text{ml}$ の tetramethylbenzidine) $100 \mu\text{l}$ を各ウエルに加え、室温で30分間インキュベートした。 $2\text{N-H}_2\text{SO}_4$ を加えて反応を停止し、 $450 \text{nm}/655 \text{nm}$ における吸光度をmultiplate reader (Model 3550, BioRad) により測定した。測定時、濃度既知のMK標準物質についても同様な操作で実施し、標準曲線を作成した。

(2) ウサギ抗ヒトMK抗体溶解緩衝液は、 50mM PBSに替えて、 50mM Tris-HCl ($\text{pH } 8.1-8.3$) を用い、さらに、 0.15M NaClを該緩衝液に含ませ、抗体濃度は $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ とした点、2) ブロッキング液を、 0.5% BSAに替えて、 0.1% カゼインを含むPBSを使用した点、および3) ペルオキシダーゼ (POD) 標識ニワトリ抗ヒトMK抗体溶解緩衝液を、 0.5M KCl、 0.1% カゼイン、 0.5% BSA、 $1 \text{mg}/\text{ml}$ ウサギγグロブリン、および 0.01% Microcide I (aMReSCO, Solon, Ohio) を含む 50mM Tris-HCl ($\text{pH } 8.2-8.4$) とした点、が上記(1)と異なり、それ以外は、上記(1)と同様の方法で1-ステップサンドイッチ法によるMKの測定を行った。

[試験例1] 肝細胞癌の各ステージと血清中のMKレベルとの相関

(1) 血清サンプルの調製

健常人135名 (男性: 94名、女性: 41名、年齢21~75)、肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma: HCC) 患者76名 (ステージI: 7名、ステージII: 19名、ステージIII: 23名、及びIV: 27名)、及び肝疾患対照としてウイルス肝炎患者7名、腺癌患者72名 (ステージ1: 23名、ステージ2: 9名、ステージ3: 7名、ステージ4: 9名、ステージ5: 5名、ステージ6: 9名、及びステージ7: 10名)、から採血し血清を調製した。血清は直ちに凍結し、MK測定まで、 -20°C で保存した。

その後、さらに新たに健常人376名（男性152名、女性224名）から採血し血清を調製した。

（２） 血清中のMKレベルの測定

HCC患者、ウイルス肝炎患者、及び健常人135名、のそれぞれの血清中のMKレベルを、実施例2の（１）に記載の方法で測定した（図1）。図中のバーは標準偏差を示す。HCC患者の血清中のMKレベルは、ステージIIから、健常人のそれよりも有意に高くなることが認められた。

EIAの感度を高めた実施例2の（２）の1ステップサンドイッチ法を用いて、上記HCC患者、ウイルス肝炎患者、及び健常人376名、のそれぞれの血清中のMKレベルを測定した（図2）。図中のバーは標準偏差を示す。

HCC患者のステージIにおける血清中のMKレベルは0.22 ng/mL（平均値）と、健常人の0.02 ng/mL（平均値）に対して有意（** $p < 0.01$; Mann-Whitney検定）に高かった。すなわち、MKは、早期のHCCの血清腫瘍マーカーとして、きわめて有用であることが明らかとなった。

〔試験例2〕 HCCにおけるPIVKA-II及びAFPとの比較試験

PIVKA-II及びAFPは、現在HCCの腫瘍マーカーとして広く用いられている。PIVKA-IIとAFPは相補的な関係にあり、PIVKA-IIとAFPの組み合わせで診断率は上がる。そこでAFPとPIVKA-IIを、比較対照の腫瘍マーカーとした。

血清中のPIVKA-IIは、エイテストPIVKA-II（三光純薬株式会社）を用いて測定した（図3）。測定方法はEIAである。HCCは、ステージIIIから陽性である可能性が示唆された。

血清中のAFPは、 α -フェト・リアビーズ（ダイナボット社）を用いて測定した（図4）。測定方法はイムノラジオメトリックアッセイ（IRMA）である。AFPは、HCCのステージIでは検出されず、ステージIIから検出されることが示唆された。

すなわち、MKは、HCCを早期に検出することが可能であり、さらに、HC

Cのステージの進行と、血清中のMK濃度上昇との間には強い相関関係が認められた。

〔試験例3〕 胃癌の各ステージと血清中のMKレベルの相関

(1) 血清サンプルの調製

胃癌患者72名（ステージ1：23名、ステージ2：9名、ステージ3：7名、ステージ4：9名、ステージ5：5名、ステージ6：9名、及びステージ7：10名）、から採血し血清を調製した。血清は直ちに凍結し、MK測定まで、 -20°C で保存した。健常人135名あるいは健常人376名の血清中のMKレベルは、それぞれ、試験例1の数値を用いた。

(2) 血清中のMKレベルの測定

胃癌の各ステージ（1～7）における血清中のMKレベルと健常人135名のそれを図5（図中バーは標準偏差を示す）に、また、健常人が376名の場合を図6（** $p < 0.01$; Mann-WhitneyのU検定；図中バーは標準偏差を示す）にそれぞれ示す。

図6から、胃癌患者の血清中のMKレベルは、ステージ1から、健常人のそれよりも有意に高くなっていることが認められた。すなわち、MKは胃癌の早期診断の腫瘍マーカーとして有用であることが明らかとなった。

〔試験例4〕 胃癌におけるCEA及びCA19-9との比較試験

比較対照の腫瘍マーカーとして、CEA、及びCA19-9を選んだ。CEAは、各種消化器癌をはじめとして、種々の癌でも血清レベルの上昇が見られ、広く臨床応用されている。一方、CA19-9は、膵、胆道系の癌で高い陽性率値を示すことが明らかとなった。現在、CA19-9は、CEAと並んで、消化器癌の腫瘍マーカーとして日常診療上最も普及している。

血清中のCEAをCEAリアビーズ（ダイナボット社）を用いて、胃癌患者の血清中のMKレベルを測定した（図7；図中のバーは標準誤差を示す）。測定方法は、IRMAである。CEAは、ステージ7から陽性とされる可能性が示唆さ

れるが、各ステージ間での標準偏差が大きく、ステージ間での有意差が認められない。

血清中のCA19-9は、セントコアCA19-9RIAキット（Centocor社；正常値：37U/ml以下、）を用いて測定した（図8；図中バーは標準誤差を示す）。測定方法は、IRMAである。CA19-9は、ステージ5でのみ高値を示しており、ステージとの相関性はないものと推測される。

すなわち、MKは、早期胃癌の血清腫瘍マーカーとして有用であることが明らかとなった。

〔試験例5〕 胃癌患者と肺癌患者の血清中のMKレベル

胃癌患者と肺癌患者の早期ステージにおいて、血清中のMKレベルを調べた（表1）。胃癌患者及び肺癌患者の両者とも、ステージIにおける血清中のMKレベルの平均値は、ステージII～IVのそれよりも低い値を示したが、その差は胃癌患者と肺癌患者の両者ともに統計的に有意ではなかった。

表1 血清中のMKレベル（ng/ml）

	ステージ	
	I	II～IV
胃癌(n=31)	0.73(n=18)	0.93(n=13)
肺癌(n=21)	1.21(n=11)	2.05(n=8)

〔試験例6〕 癌患者尿中のMKレベルの測定

癌患者尿（胃癌：24名、肝細胞癌：24名、大腸癌：24名）72検体、及び健常人の人間ドック時における早朝尿50検体中のMKレベルを実施例2の（2）の方法で測定した。また、同じ尿中のクレアチニン値を測定し、クレアチニン値でMKの値を補正した。結果を図9に示す。健常人と癌患者の尿中MK値の間に有意差（ $p < 0.01$ ；Mann-WhitneyのU検定を使用）が認められた。

〔試験例7〕 癌患者の尿中MK値と癌のステージとの相関

19

癌患者の尿中MK値が癌のステージとの相関を調べた。胆管癌3名、乳癌3名、大腸癌6名、食道癌3名、胆嚢癌1名、肝細胞癌10名、膵臓癌3名、直腸癌7名、胃癌28名、及び甲状腺癌1名、の計65名の患者について、ステージ分け（stage 1～7）を行い、尿中MKレベルを測定した。各ステージにおけるMKレベルを尿中MK補正值で図10に示す（* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$; Mann-WhitneyのU検定）。尿中MKレベルが、癌のステージIで、健常人に対して有意に上昇することが明らかとなった。これまで、癌の早期ステージに上昇する尿中の腫瘍マーカーは報告されていない。すなわち、尿中のMKレベルは、各種癌の早期スクリーニングに有用である。

〔試験例8〕 HCCにおける腫瘍除去が血清中のMKレベルに与える影響

HCC患者5名について、外科手術による腫瘍除去が血清中のMKレベルに与える影響を調べた（図11）。4名で、腫瘍除去7日後に血清中のMKレベルが有意に低下した。すなわち、血清中MKレベルは、HCC治療効果を反映している。

〔試験例9〕 各種癌における血清中のMKレベル

食道癌18名、胃癌30名、十二指腸癌2名、結腸25名、肝細胞癌25名、胆管癌及び胆嚢癌12名、膵臓癌9名、甲状腺癌5名、肺癌19名、及び乳癌5名、計150名の癌患者について、ステージの内訳を表2に示す。この150名の癌患者の血清中のMKレベルをEIAで測定した結果を図12に示す。150名の癌患者の血清中のMKレベルは健常人のそれとは有意な差（ $p < 0.001$ 、Mann-Whitney U-test）を示した。患者の87%が、cut off値の0.5 ng/mLよりも大きい血清中MKレベルを示した。

表 2

	0	I	II	III	IV	再発
食道癌		5	4	6	2	
胃癌		18	2	6	4	
十二指腸癌		0	0	2	0	
大腸癌	1	4	4	5	5	6
肝細胞癌		0	11	9	2	3
胆管及び胆嚢癌		2	4	4	2	
膵臓癌		5	0	1	3	
甲状腺癌		0	4	1	0	
肺癌		11	1	6	1	
乳癌	0		3	0	1	

産業上の利用の可能性

本発明により、早期癌の診断に有用な腫瘍マーカーが提供された。該腫瘍マーカーは、早期癌のスクリーニング、ある種の癌のステージと予後の推定、治療経過のモニタリングとして有用である。

2 1

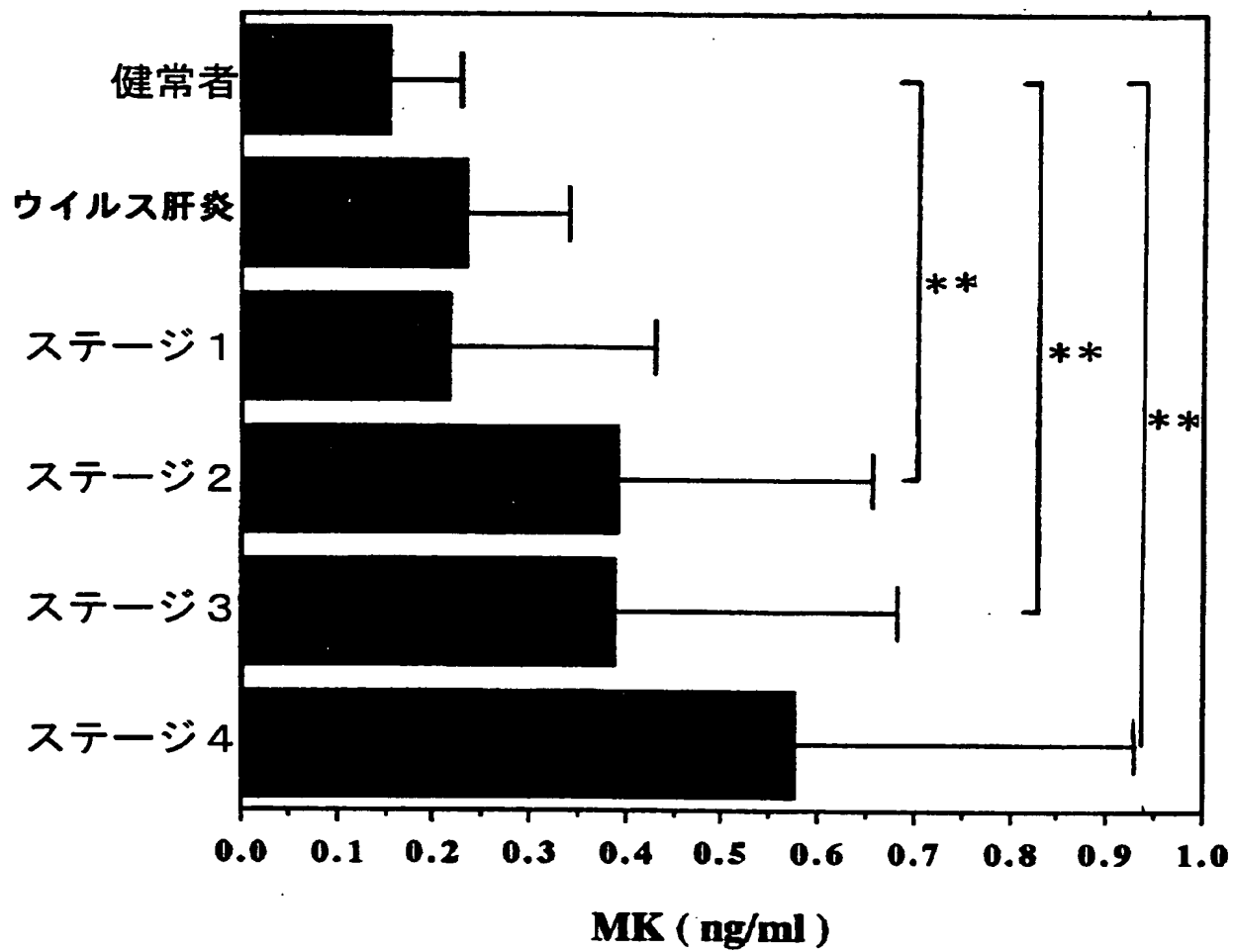
請求の範囲

1. 次の行程を含む、早期癌の検出方法：
 - a) 生物学的試料中のミッドカインおよび／またはそのフラグメントを測定する行程、
 - b) 行程 a) によって得られる測定値を正常者の測定値と比較する行程、
2. 早期癌が、胃癌である請求項 1 に記載の方法。
3. 胃癌がステージ 1 である請求項 2 に記載の方法。
4. 早期癌が、肝細胞癌である請求項 1 に記載の方法。
5. 肝細胞癌がステージ I である請求項 4 に記載の方法。
6. 早期癌が、肺癌である請求項 1 に記載の方法。
7. 肺癌がステージ I である請求項 6 に記載の方法。
8. 生物学的試料が血清または尿である請求項 1 に記載の方法。
9. ミッドカインおよび／またはそのフラグメントを認識する抗体の早期癌の検出における使用。
10. ミッドカインおよび／またはそのフラグメントを認識する抗体からなる早期癌の診断剤。
11. 生物学的試料中のミッドカインおよび／またはそのフラグメントの存在を決定するための早期癌検出キットであって、ミッドカインおよび／またはそのフラグメントの少なくとも 1 つのエピトープを認識する抗体を収容する容器を含む早期癌検出キット。
12. 前記抗体が固相に吸着している請求項 11 に記載の早期癌検出キット。
13. 次の行程を含む、癌の予後判定方法。
 - a) 生物学的試料中のミッドカインおよび／またはそのフラグメントを測定する行程、
 - b) 行程 a) によって得られる測定値を癌の予後判定と関連付ける工程、
14. 癌が、胃癌、肝細胞癌、または肺癌である請求項 13 に記載の方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 12

図 1

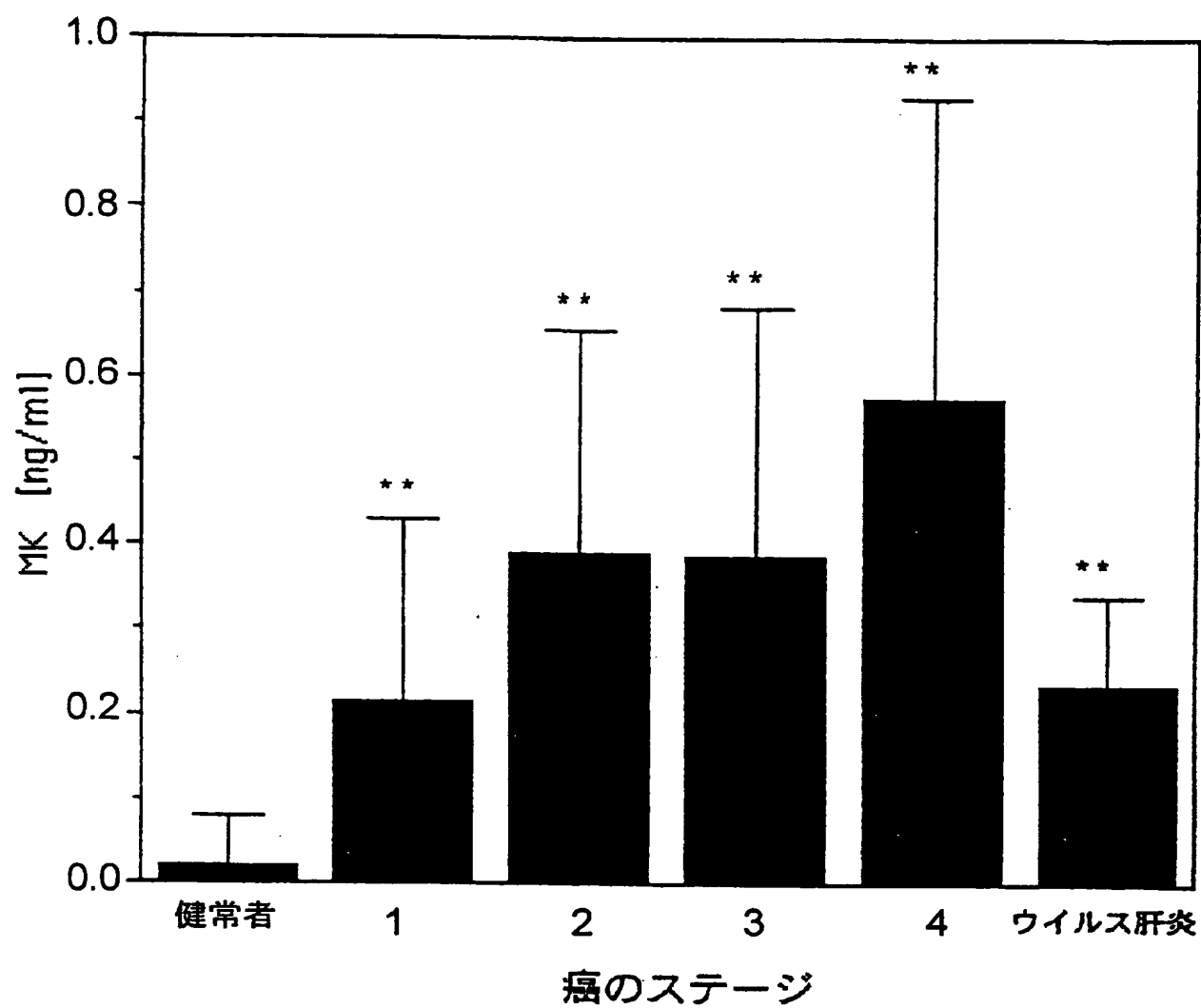


THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 12

図 2

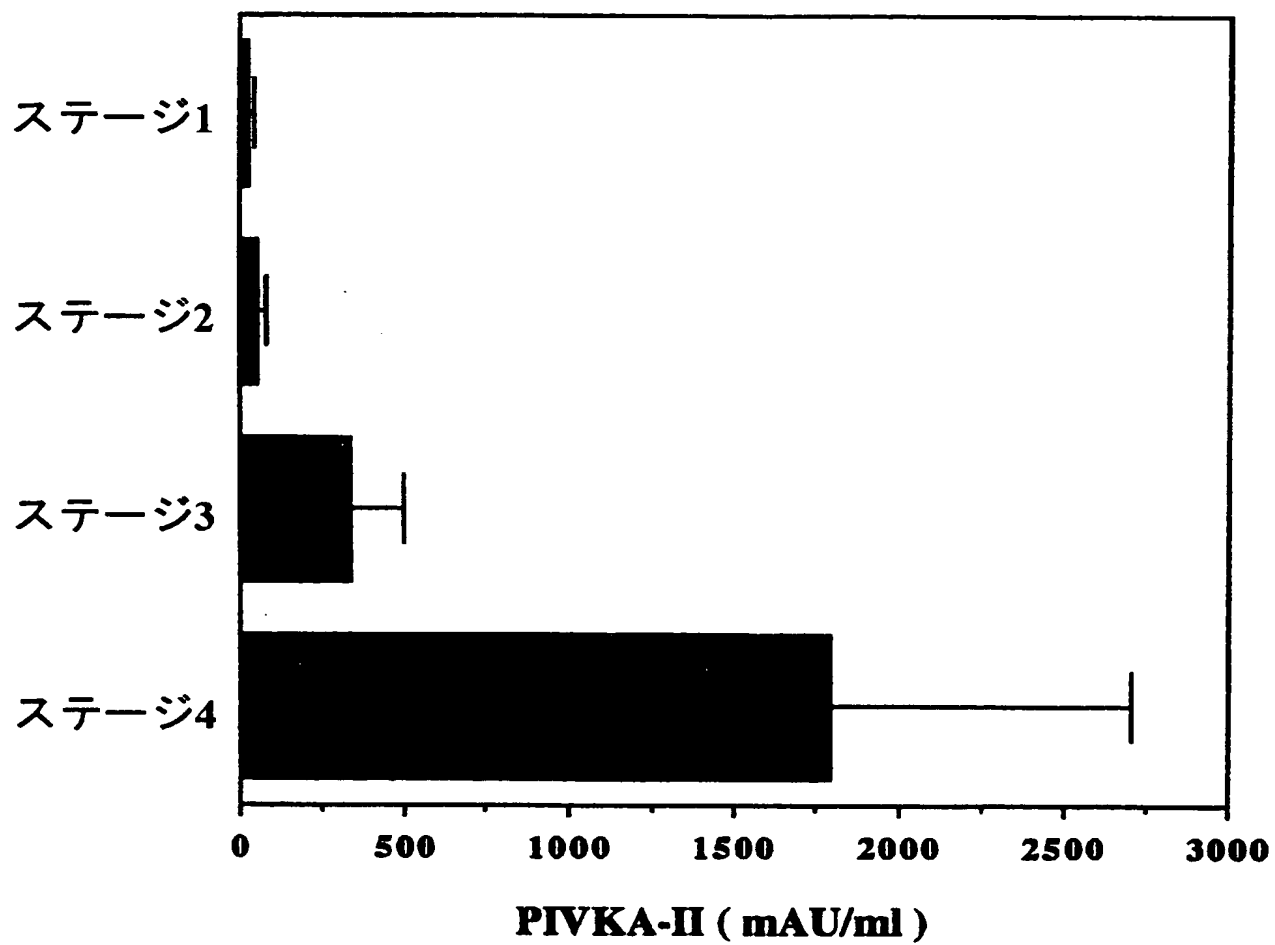
MKと肝臓癌ステージの関係



THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 12

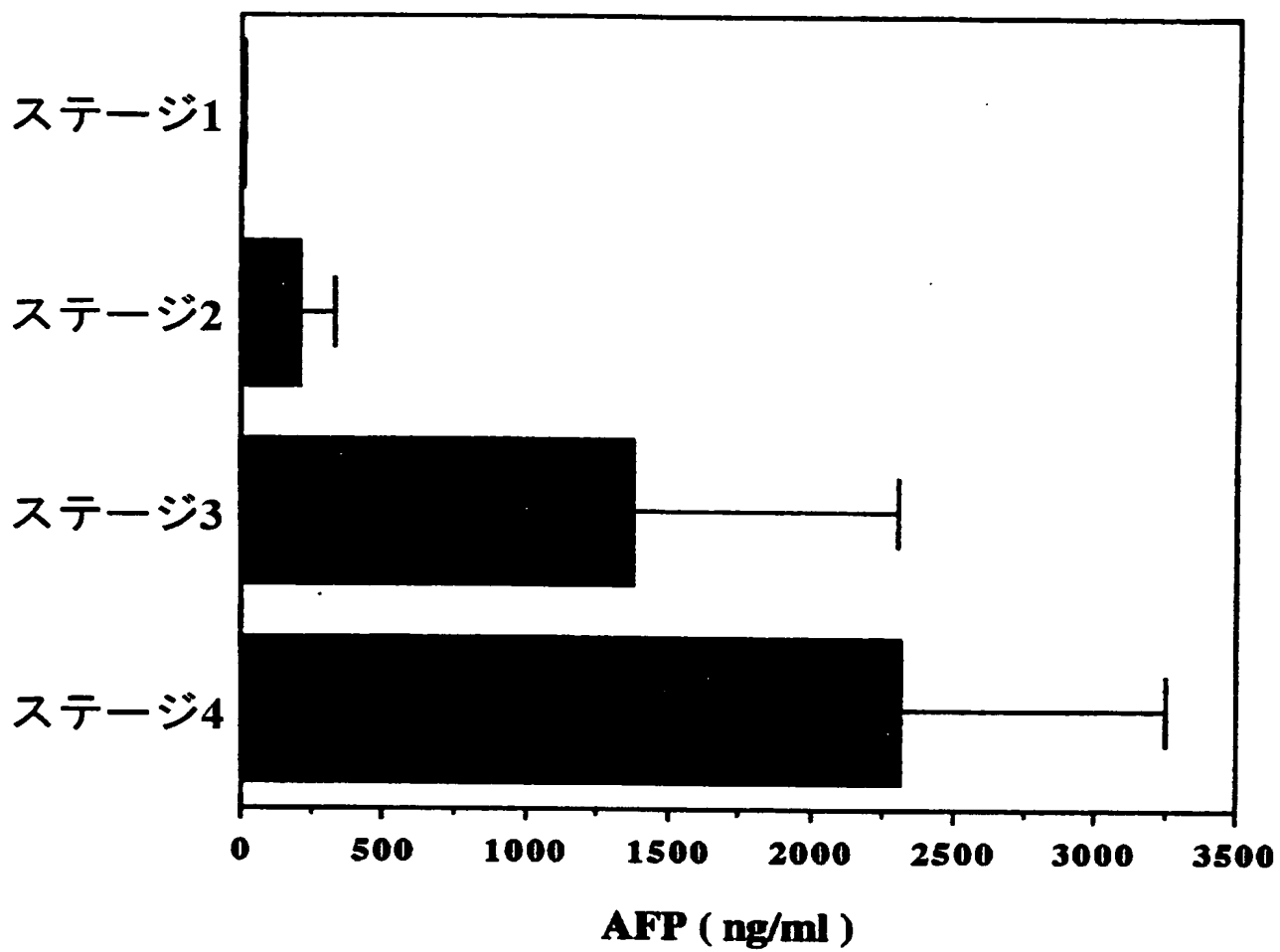
図 3



END
BLANK (USPTO)

4 / 12

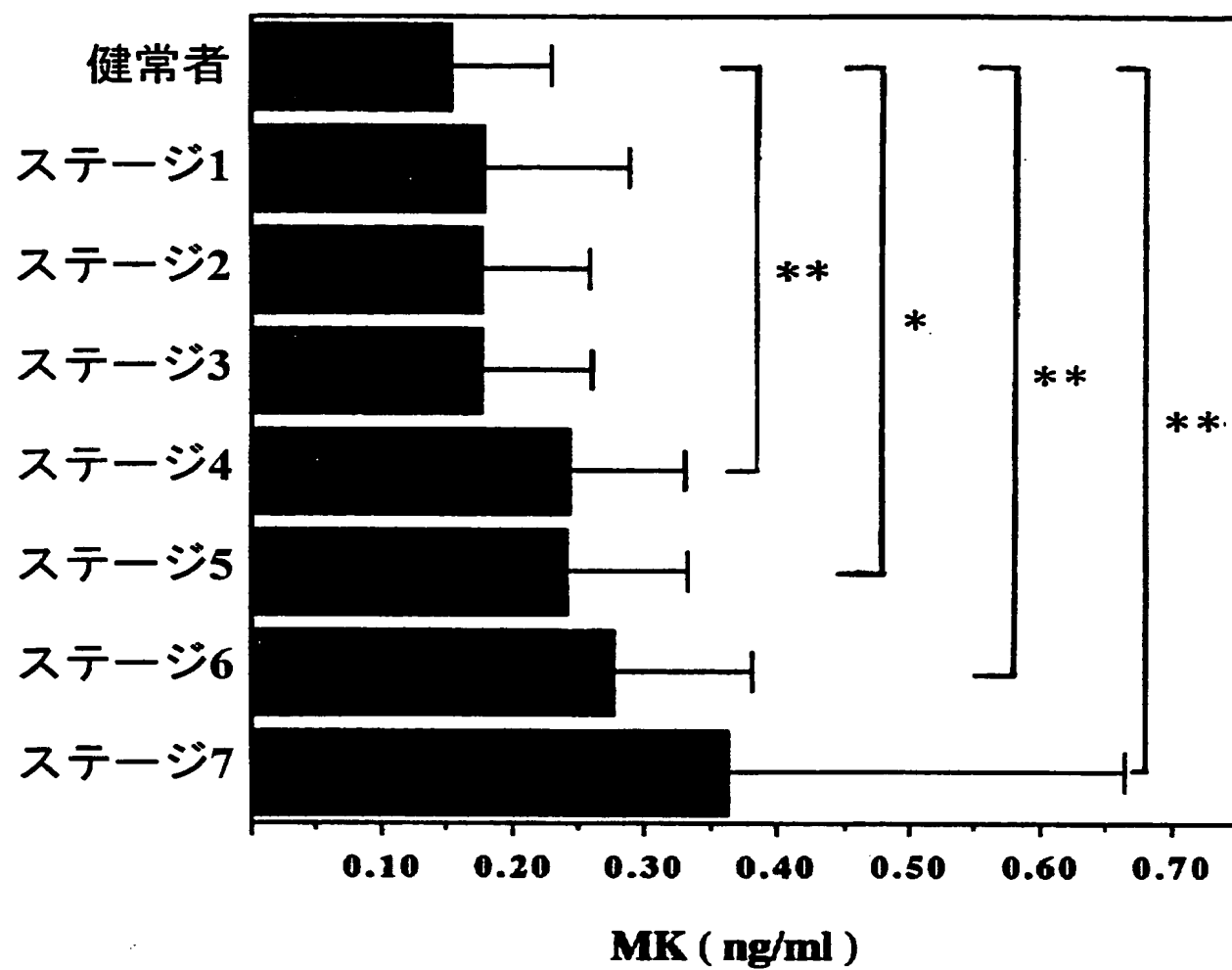
図 4



THIS PAGE BLANK (uspto)

5 / 12

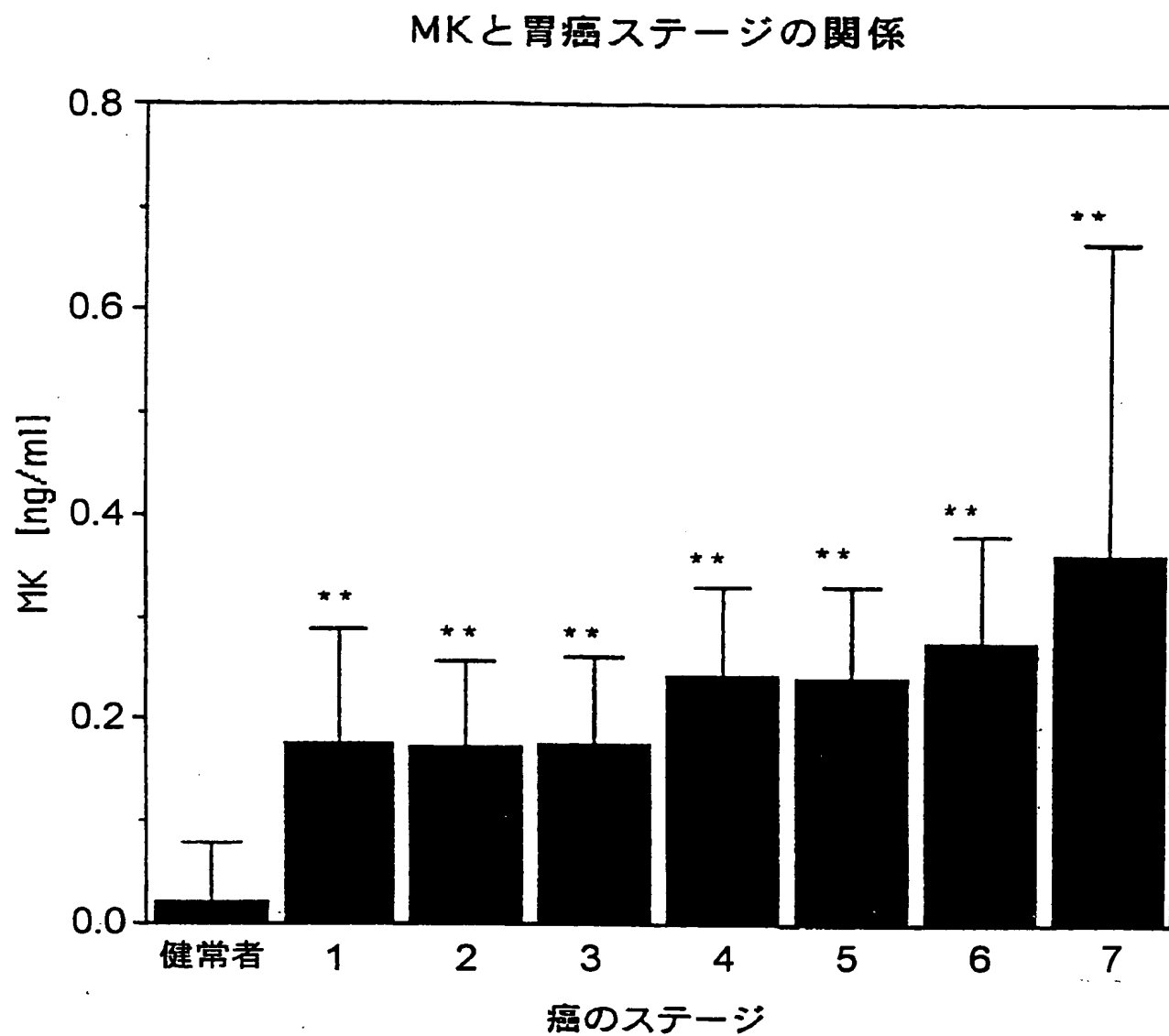
図 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 12

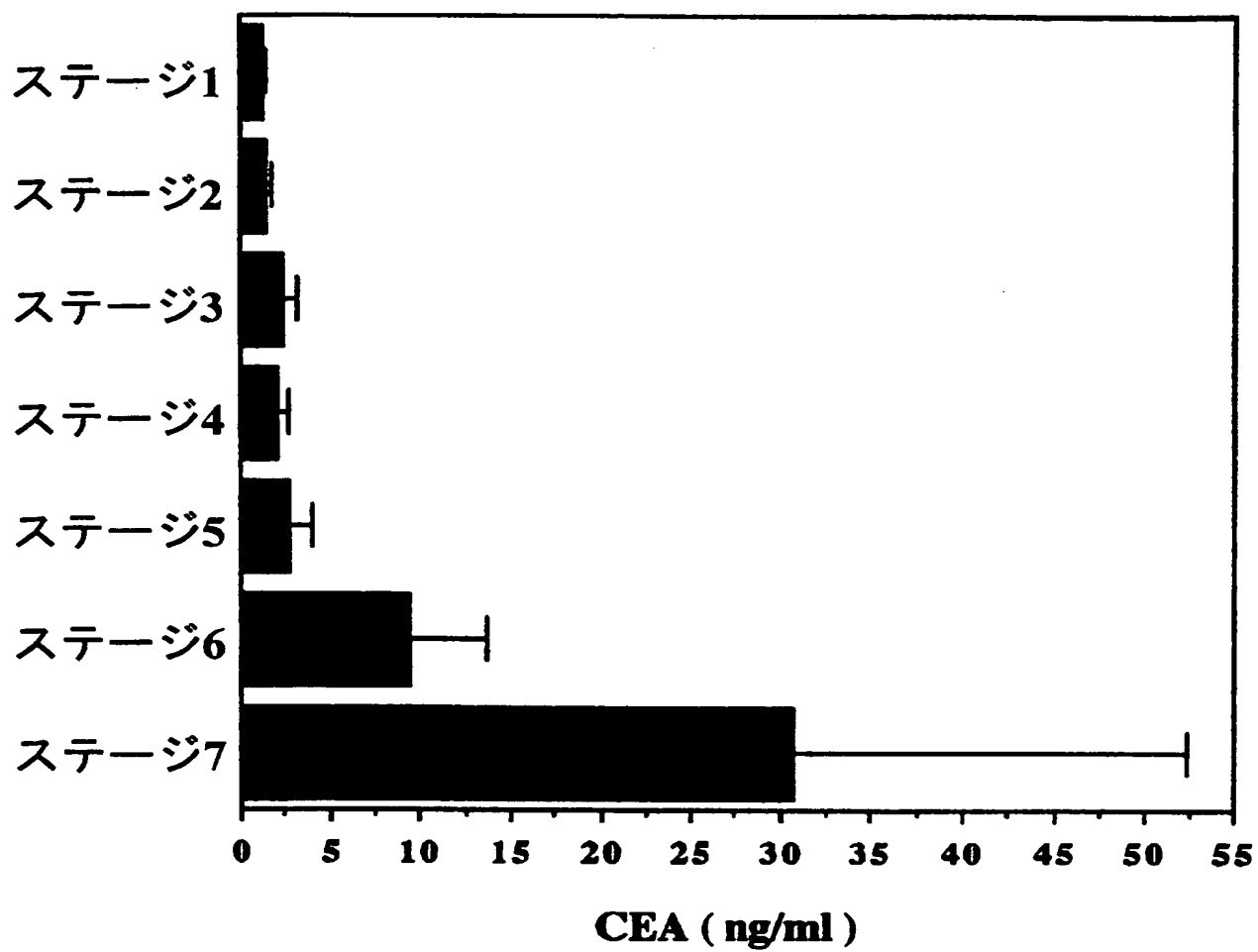
図 6



SLIT P AGE BLANK (uspro)

7 / 12

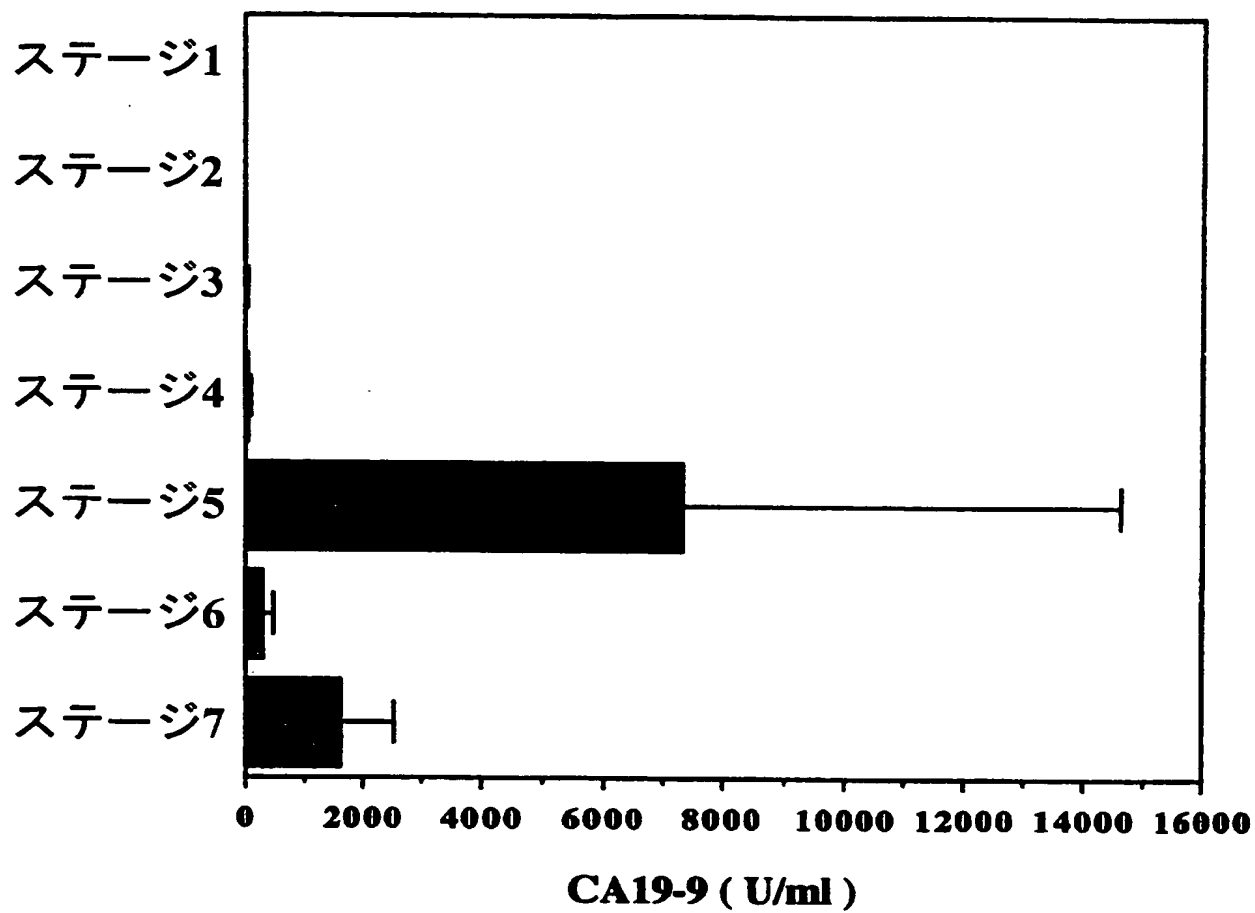
図 7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

8 / 12

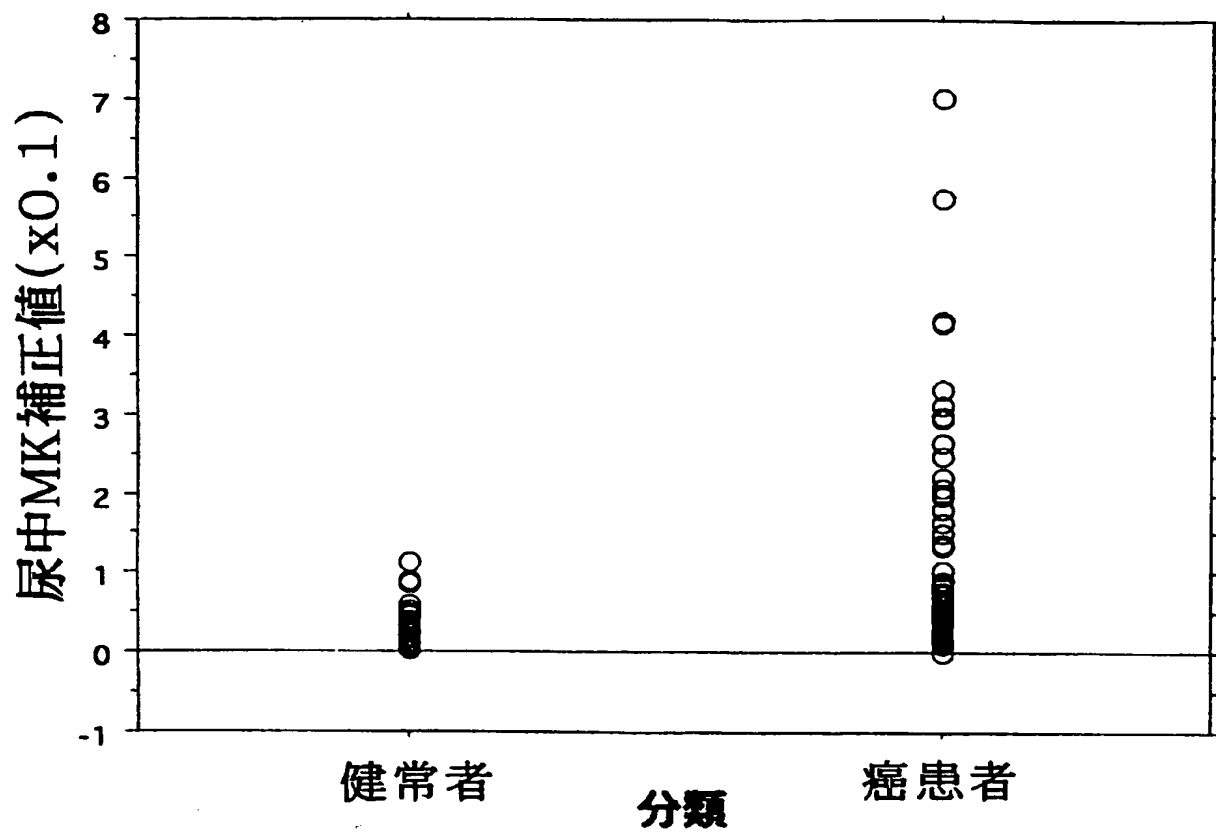
図 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

9 / 12

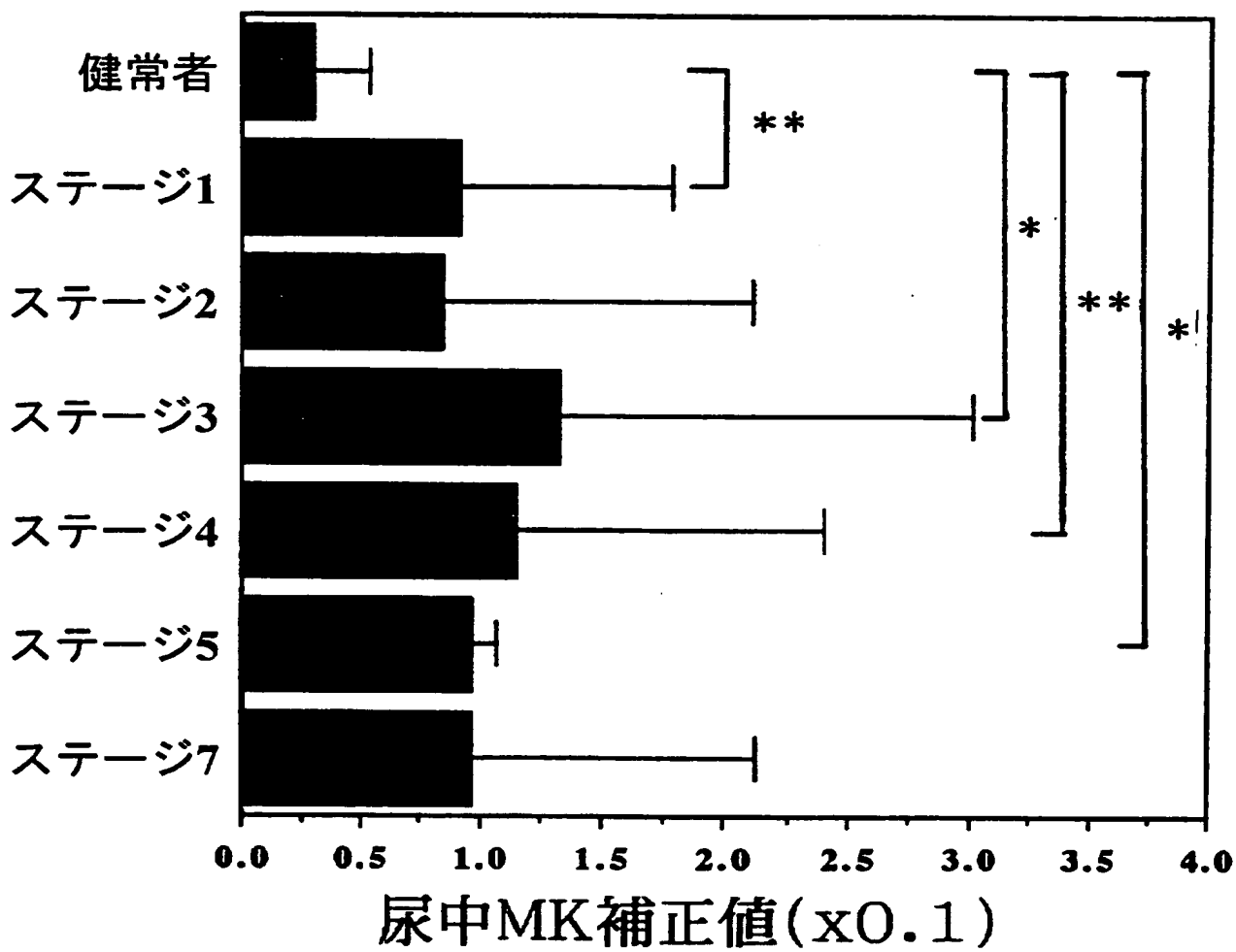
図 9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/12

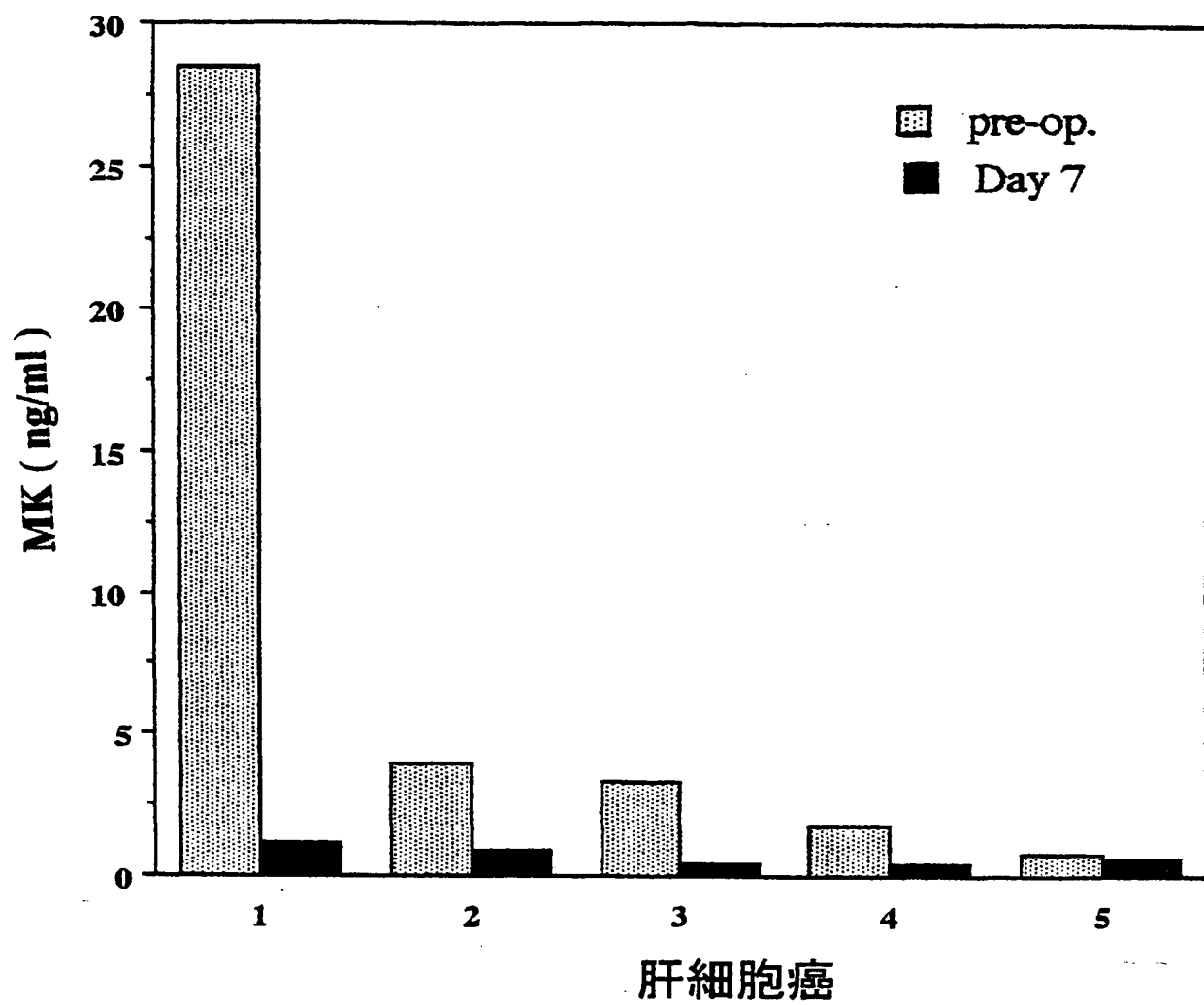
図10



THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/12

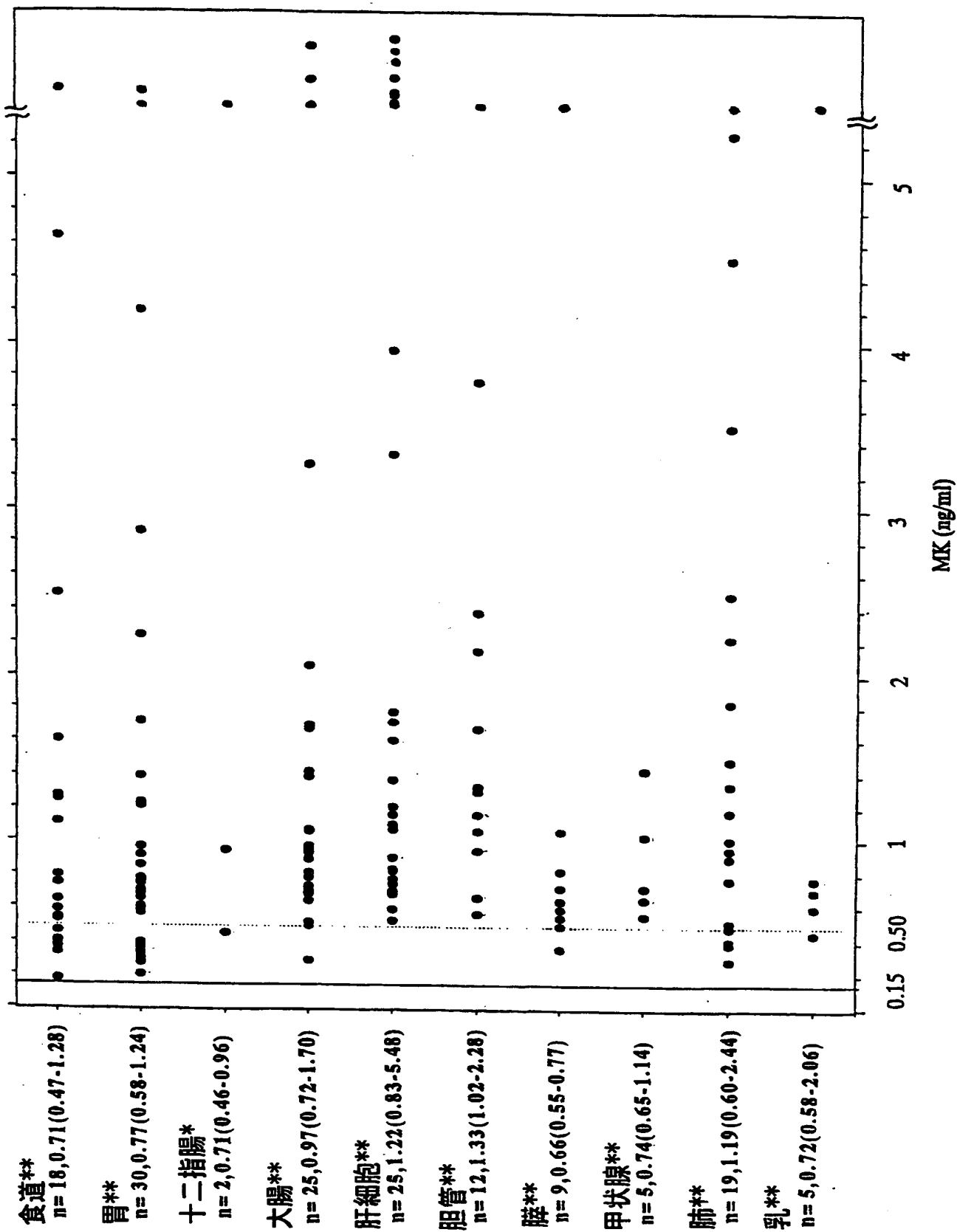
図 11



5 PAGE BLANK (USPTO)

12/12

図 12



THIS PAGE BLANK (uspro)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N 33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nakagawara et al., "Differential Expression of Pleiotrophin and Midkine in Advanced Neuroblastomas" Cancer Res., Vol.55, No.8, pp.1792-1797 (1995)	1-14
Y	Ye et al., "Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer" British J. Cancer, Vol.79, No.1, pp.179-184 (January 1999)	1-14
Y	JP, 6-172218, A (Mitsui Toatsu Chemicals Inc.), 21.06.94 (21 June, 1994) (Family: none)	1-14
P, A	WO, 00/31541, A (Georgetown University), 02.06.00 (02 June, 2000) (Family: none)	1-14
A	JP, 6-113898, A (Mitsui Toatsu Chemicals Inc.), 26.04.94 (26 April, 1994) (Family: none)	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 November, 2000 (01.11.00)

Date of mailing of the international search report
14 November, 2000 (14.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/574

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Nakagawara et al, 「Differential Expression of Pleiotrophin and Midkine in Advanced Neuroblastomas」 Cancer Res., Vol. 55, No. 8, P. 1792-1797 (1995)	1-14
Y	Ye et al, 「Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer」 British J. Cancer, Vol. 79, No. 1, P. 179-184 (Jan. 1999)	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.11.00

国際調査報告の発送日

14.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

2J

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 6-172218, A (三井東圧化学株式会社) 21. 06. 94 (21. 6月. 1994) (ファミリーなし)	1 - 1 4
P, A	WO, 00/31541, A (Georgetown University) 02. 06. 00 (02. 6月. 2000) (ファミリーなし)	1 - 1 4
A	JP, 6-113898, A (三井東圧化学株式会社) 26. 04. 94 (26. 4月. 1994) (ファミリーなし)	1 - 1 4



Creation date: 12-11-2003
Indexing Officer: SBELETE - SEBLE BELETE
Team: OIPEBackFileIndexing
Dossier: 10070569

Legal Date: 09-09-2002

No.	Doccode	Number of pages
1	NPL	6
2	NPL	6

Total number of pages: 12

Remarks:

Order of re-scan issued on

